



simpósio estadual de AGROENERGIA

IV reunião técnica de agroenergia - RS

ESTUDO DA INDUÇÃO DE VARIAÇÃO GENÉTICA EM CLONES DE CANA-DE-AÇÚCAR ATRAVÉS DE MARCADORES MICROSSATÉLITES.

Raquel Bartz Kneib¹, Lorena Pastorini Donini², Sabrina Kneib³, Vanessa Galli⁴, Roberta Bartz Kneib¹,
Sérgio Delmar dos Anjos e Silva⁵

INTRODUÇÃO

A cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) tem grande importância econômica na agricultura no Brasil com a utilização do etanol em escala mundial (OLIVEIRA et al., 2010). O melhoramento baseia-se na seleção e clonagem de genótipos superiores presentes em populações segregantes, que são obtidos através de cruzamentos sexuais entre indivíduos diferentes (SOUZA, 2001).

A técnica de propagação vegetativa in vitro, também denominada de micropropagação permite a clonagem de genótipos mantendo a limpeza clonal além de acelerar a propagação vegetativa em relação aos métodos convencionais (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Para a cana-de-açúcar, esta técnica é bastante vantajosa, considerando que um dos maiores problemas enfrentados em programas de melhoramento genético convencionais nessa cultura é a dificuldade de multiplicar o material selecionado com rapidez (DONATO et. al., 2005). No entanto, fatores como fonte de explantes, tempo de cultura, número de subculturas, utilização de fitormônios, genótipo, composição dos meios, o nível de ploidia e mosaicismo genético são capazes de induzir a ocorrência de variações genéticas in vitro (SILVAROLLA, 1992).

Afim de detectar variações somaclonais, os marcadores moleculares são uma ferramenta rápida e eficaz, pois detectam o polimorfismo diretamente ao nível do DNA sem sofrer qualquer tipo de influência ambiental (CLOUTIER; LANDRY, 1994). O objetivo deste trabalho foi verificar se há variabilidade genética entre clones da variedade RB855156 de cana-de-açúcar, através da utilização de marcadores moleculares do tipo microssatélites.

¹Estudante de agronomia - UFPel, bolsista Embrapa Clima Temperado. raquelkneib@yahoo.com.br

²Dr^a. Bolsista de Desenvolvimento Tecnológico Industrial do CNPq - Nível 1. E-mail: lorenadonini@yahoo.com.br

³Bolsista Embrapa Clima Temperado. sabrinakneib@yahoo.com.br

⁴Doutoranda no Programa de Pós-graduação em Biotecnologia – UFRGS. vane.galli@yahoo.com.br

⁵Eng. Agrônomo, Dsc. em Melhoramento Genético, Pesquisador - Embrapa Clima Temperado
sergio.anjos@cpact.embrapa.br

MATERIAL E MÉTODOS

Plantas da variedade RB855156 foram micropropagadas no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Clima Temperado utilizando-se como fonte de explante inicial o meristema apical.

Para a análise de variação somaclonal o DNA foi extraído de folhas jovens segundo o protocolo descrito por FERREIRA & GRATAPAGLIA (1996). Foram coletadas amostras da planta-mãe, material de 4^a, 5^a, 9^a, 10^a e 11^a repicagem. A quantificação para ajuste de diluição do DNA extraído foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1 % em comparação com concentrações conhecidas do marcador λ Hind III. Foram utilizados 11 pares de *primers* (Tabela 1) dentre os 31 sintetizados para o genoma da cana-de-açúcar, com base no trabalho de SINGH et. al (2010).

Tabela 1. Pares de *primers* utilizados na caracterização dos genótipos de cana-de-açúcar com respectiva sequência e temperatura de anelamento. Embrapa Clima Temperado, 2012, Pelotas, RS.

Primer	Sequência	TA*
SCM18	Forward - CATCAGTATCATTTTCATCTTGG Reverse - CAGTCACAGTCGGGTAGA	55° C
SCM27	Forward - TTCTCTGACTTCCAATCCAA Reverse - ATCAAGCACGCCCGCCTC	55° C
SCM32	Forward - GATGAAGCCGACACCGAC Reverse - AGTTGCCTGTTCCCATT	50° C
SOMS118	Forward - GAGGAAGCCAAGAAGGTG Reverse - TAGAGCGAGGAGCGAAGG	55° C
SOMS120	Forward - GCATCTATCGGTCTTCTGG Reverse - ATCCAATCCTTCATCTTCTTC	52° C
SOMS143	Forward - TGAAGTTGGAATAACACAAAGAA Reverse - ATGGGATGGATAATAAGCAGT	52° C
SOMS156	Forward - ATCGTCTCTGGTTGTTGGT Reverse - ATCCTCCATTTCACCTC	52° C
UGSM60	Forward - CGACTCCACACTCCACTC Reverse - CCGAACACCACCTTCTTG	55° C
UGSM193	Forward - AGATATAACACACACACACAAA Reverse - GGCCATCGAGGAGGAGTTCAAG	55° C
UGSM296	Forward - ATTATCTACATTTCAGACACGTCAC Reverse - ATCTTTGTTAGCAATCCATTAAG	55° C
UGSM681	Forward - ACACATCGCTTTCCCACA Reverse - GCATACCTGTCGTCGTCT	55° C

* Temperatura de anelamento

As reações de amplificação foram desenvolvidas numa reação de 12,5 μ l contendo 6,25 μ l de GoTaq Master Green Mix, 50 ng de DNA e 1,25 μ l de *primer forward* e *primer Reverse* na concentração de 10 μ M. A amplificação foi constituída por 25 ciclos, após uma desnaturação inicial a 94 °C durante 5 minutos. Cada ciclo consistiu em um minuto a 94 °C, um minuto com

temperatura variando de 50 a 55 °C, de acordo com o *primer* e 2 minutos a 72 °C, com uma extensão final de 7 minutos a 72 °C. Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose 3,5% e fotografados sob luz UV.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base no perfil de bandas obtidos e nos marcadores utilizados não foi possível observar variação genética nas repicagens do material da cultivar RB855156 (Figura 1). Isso demonstra que para até onze repicagens a técnica de micropropagação poderia ser utilizada para clonagem de plantas de cana-de-açúcar.

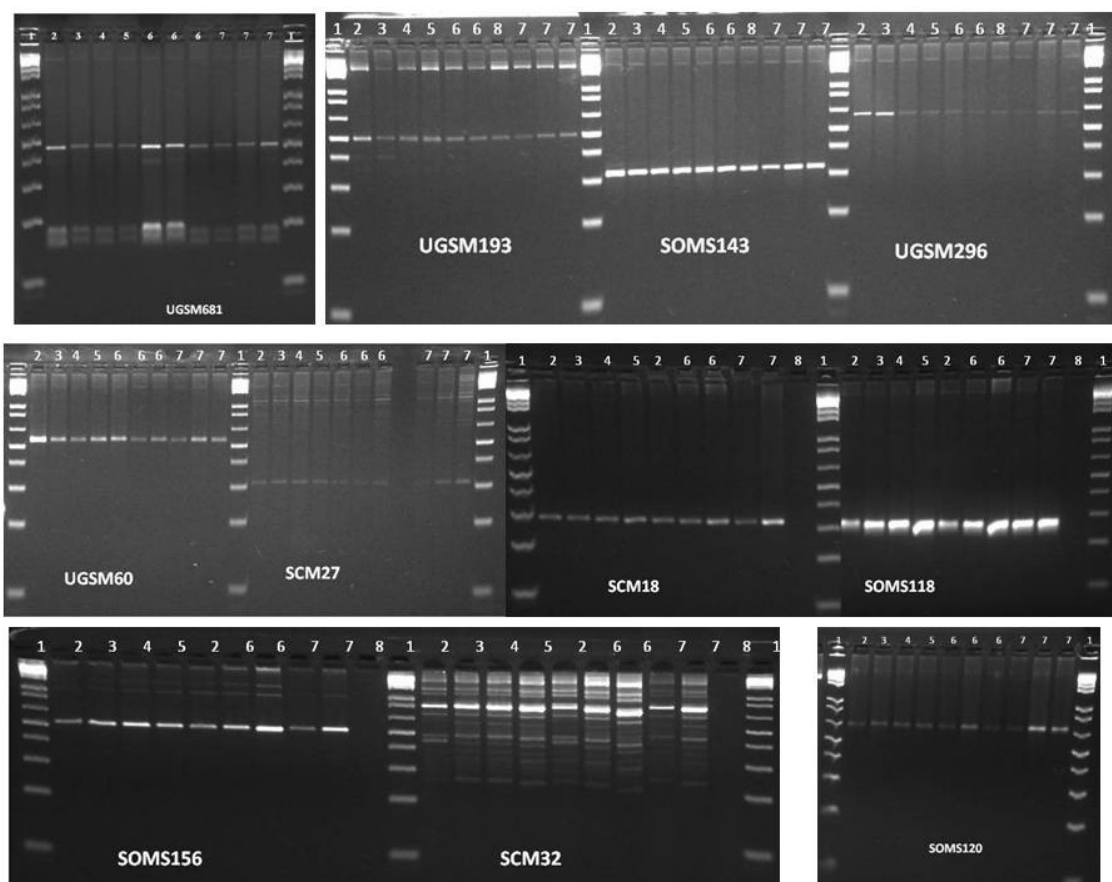


Figura 1: Imagem do perfil de bandas com 11 *primers* microssatélites. 1-1 Kb Plus; 2- Planta mãe; 3-4° repicagem; 4-5° repicagem; 5- Planta mãe; 6-9° repicagem; 7-10° repicagem; 8-10° repicagem; 9-11° repicagem; 10-11° repicagem; 11-água. Fonte: Raquel Kneib, 2012.

CONCLUSÕES

A técnica de micropropagação até a décima primeira repicagem não induziu variação genética nos loci analisados com base nos 11 *primers* microssatélites utilizados no estudo, porém mais estudos são necessários para maior confiabilidade desta informação.

REFERÊNCIAS

CLOUTIER, S.; LANDRY, B.S. Molecular markers applied to plant tissue culture. In **Vitro Cell. Develop. Biol.** 30:32-39. 1994.

DONATO, V. M.T.S.; ANDRADE, A.G.; TAKAKI, G.M.C.; MARIANO, R.L.R.; MACIEL, G.A. Plantas de cana-de-açúcar cultivadas in vitro com antibióticos. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 29, n. 1, Feb. 2005 .

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 1996.(EMBRAPA-CENARGEM. Documentos).

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S. **Cultura de Tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA CNPH, p.183-260, 1998.

OLIVEIRA, A.L.B.; FERREIRA, L.T.; HERCULANO, L.; OLIVEIRA, R.A.; PEREIRA, J.A.F.; CAMARA, T.R. Ação do hipoclorito na assepsia de explantes de cana-de-açúcar para embriogênese somática. In: X Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFRPE - JEPEX, 2010, Recife. **ANAIS DA X JEPEX**. RECIFE : EDITORA DA UFRPE, 2010.

SILVAROLLA, M.B. **Plant genomic alterations due to tissue culture**. J. Brazil. Assoc. Adv. Sci. 44:329-335. 1992.

SINGH, R.K.; MISHRA, S.K.; SINGH, S.P.; MISHRA, N.; SHARMA, M.L.. Evaluation of microsatellite markers for genetic diversity analysis among sugarcane species and commercial hybrids. **Australian Journal of Crop Science**. Australia, v.4, n.2, p.116-125, 2010.SOUZA, A.P. Biologia molecular aplicada ao melhoramento. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELLO, I.S.; VALADARES--INGLIS, M.C. (Ed.) **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001, p.939-965.

ZUCCHI, M.I.; ARIZONO, H.; MORAIS, V.A.; FUNGARO, M.H.P.; VIEIRA, M.L.C. Genetic instability of sugarcane plants derived from meristem cultures. **Genet. Mol. Biol.**, São Paulo, v. 25, n.1, 2002.

